

〈総説〉

葉酸：最近の話題

西村 和子、森 和雄

Folate Up-to-date

Kazuko Nishimura and Kazuo Mori

Summary Folate is one of essential vitamin, and vital to normal cell growth and DNA synthesis. Folate deficiencies lead to megaloblastic anemia and ultimately to severe neurological problems. Folate concentration can be different depending on methods used for assessments. Therefore, there are needs for international reference materials as well as universal cutoffs of the deficiencies so that population prevalences of the deficiency can be properly determined and compared. Recently, World Health Organization (WHO) International Standard (IS) 03/178 and Standard Reference Material (SRM) 1955 were launched as reference materials for serum folate. These materials were determined using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). As a consequence, the restandardized Access folate assay, with WHO IS 03/178, is upcoming. In addition, WHO Technical Consultation defined the cutoffs for folate deficiencies.

Key words: Folate, Access, Standardization, WHO IS 03/178, SRM 1955

I. 葉酸の生理学・栄養学意義

葉酸は、ビタミンB群の一種であり、1941年ミッチェル[Herschel K. Mitchell (1913-2000)]らによりハウレンソウなどの緑葉中からある種の乳酸菌生育因子として抽出され、ラテン語の「葉」(folium)と「酸」(acid)からFolic acidと

命名された。

葉酸は、生体内や食品中では多様な形態で存在し、ヌクレオチド類の生合成やアミノ酸の代謝、タンパク質の生合成、ビタミン代謝に関与している¹⁾。名称と由来から植物性食品のみに含まれていると思われがちであるが、動物性食品であるレバーなどにも多く含まれている^{2),3)}。

ベックマン・コールター株式会社、ダイアグノスティックス学術&プロダクトマーケティング部門
〒135-0053 東京都江東区有明3-5-7, TOC有明ウエストタワー

受領日 平成24年7月20日

受理日 平成24年8月3日

Diagnostics Scientific Affairs & Product Marketing
Beckman Coulter K.K.

TOC Ariake West Tower, 3-5-7 Ariake, Koto-ku, Tokyo
135-0063, Japan

食品中葉酸の多くは、ポリグルタミン酸型として存在している³⁾。食事により摂取されたポリグルタミン酸型葉酸は、小腸粘膜にある酵素によってモノグルタミン酸型葉酸に分解されてから小腸細胞内へ吸収され、小腸膜上皮細胞内で酵素によって5-メチルテトラヒドロ葉酸に変換される⁴⁾。その後、血漿を経由して体内循環し、門脈を経由して肝臓へ輸送される⁵⁾。肝臓には、全身の約50%の葉酸が蓄積される⁶⁾。また、蓄積された葉酸は、再び変換されて胆汁へ移行し、これが消化管から再吸収され、組織に供給される(腸肝循環)⁵⁾。葉酸の体内代謝を図1に示す。

II. 葉酸の臨床的意義

葉酸欠乏症は一般的にみられ、食事からの摂取不足、腸からの吸収不良、妊娠、薬剤投与(抗がん剤・免疫抑制剤・抗けいれん剤・非経口栄養剤等)、血液透析、アルコール中毒などが原因である^{1),6)}。

葉酸は、ホモシステインからメチオニンを生成するのに必要とされるため(図2)、不足す

るとホモシステインが血中に蓄積し、動脈硬化の危険因子となる⁶⁾。その他、葉酸が不足すると造血機能が異常を来し、巨赤芽球性貧血、神経障害や腸吸収障害などが起こる⁷⁾。

巨赤芽球性貧血(B₁₂欠乏症原因の貧血と鑑別不可)は、葉酸欠乏症によるDNA合成障害の結果起こる。また、巨赤芽球性貧血は潜行的に進行し、重度になるまで症状が出現しないこともある。

また、妊娠時母体に葉酸欠乏症が認められると、先天性の神経管閉鎖障害のリスクが高まる。神経管閉鎖障害は、主に、先天性の脳や脊椎の癒合不全を指す。脊椎の癒合不全を二分脊椎といい、出生時に、腰部の中央に腫瘤が認められ、脳瘤や脳の発育がない無脳症などがある。先天異常の多くは妊娠直後から妊娠10週以前に発生しており、特に中枢神経系は妊娠7週未満に発生することが知られている。このため、多くの妊婦が妊娠して又は妊娠の疑いを持って産婦人科の外来に訪れてからの対応では遅いと考えられることから、多くの疫学研究報告と諸外国の対応では、葉酸の摂取時期を、少なくとも妊娠1か月以上前から妊娠3か月までとしている⁷⁾。

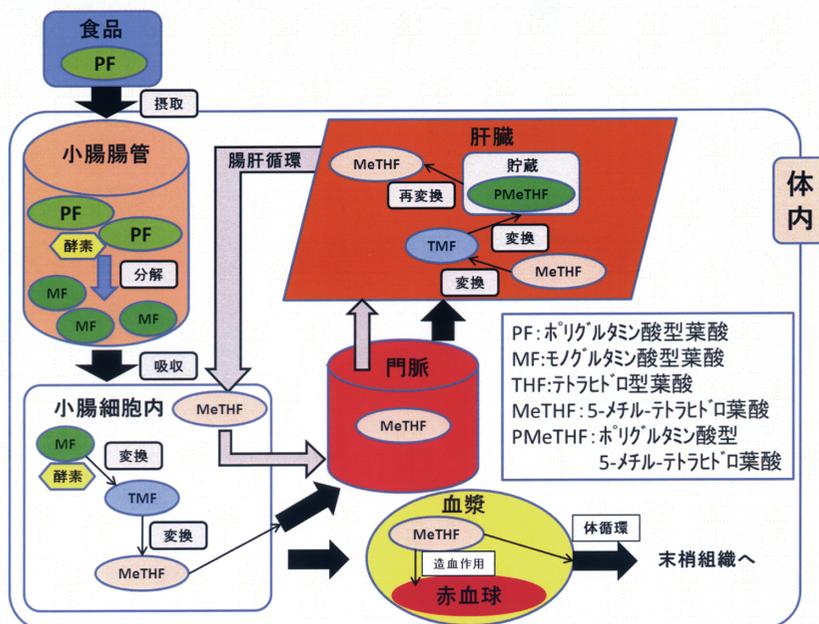


図1 葉酸の体内代謝

前述疫学研究には、葉酸と神経管閉鎖障害に関して「ケースコントロール研究」「介入研究」が行われている。ケースコントロール研究においては葉酸のサプリメントを摂取することにより35～75%のリスク低減が報告されている^{8), 9), 10), 11), 12)}。また、介入研究においては60%以上の高いリスク低減結果が報告されている^{13), 14), 15), 16), 17)}。日本においても2002年から母子手帳に葉酸摂取の記載がされている。

Ⅲ. 葉酸に関する最近の研究

1. 「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」

環境省では、2008年より日本中で10万組の子供とその両親に参加を募集する大規模な疫学調査「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」を開始した。「エコチル」とは「エコロジー」と「チルドレン」を組み合わせた造語で、調査を略して「エコチル調査」としている。

調査内容は、子供の胎児期から13歳になるまで、定期的に健康状態を確認し、環境要因が子供達の成長・発達にどのような影響を与えるかを明確にする。なぜなら、従来から環境リスクの影響は動物実験、基礎研究によりメカニズムの解明が進められてきた。一方で動物と人間とでは、形態学的、生理学的に大きな違いがある

ことから、動物実験の結果だけから人間の健康影響をすべて知ることは困難である。そのため人間に対する影響の発生有無を、実際に人間の集団で観察する疫学的な研究が重要になる。よって化学物質の曝露や生活環境など、胎児期から小児期にわたる子供たちの成長・発達に影響を与える環境要因を明らかにするため、環境省では疫学調査による研究を計画した。それが、エコチル調査である。

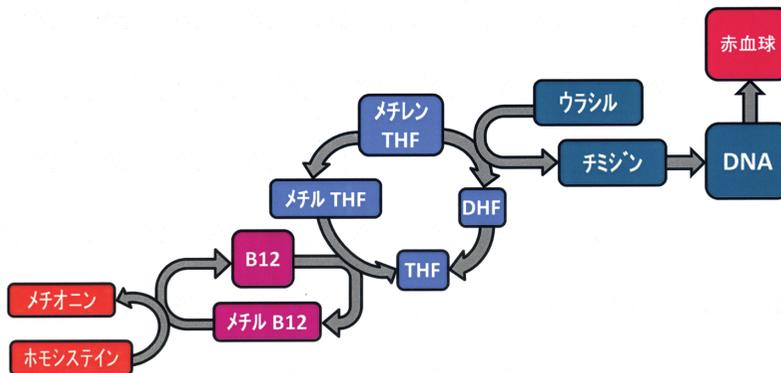
環境省が実施するエコチル調査は、「胎児期から小児期にかけての化学物質曝露をはじめとする環境因子が、妊娠・生殖、先天奇形、精神神経発達、免疫・アレルギー、代謝・内分泌系等に影響を与えているのではないか」という中心仮説を解明するため、化学物質の曝露などの環境影響以外にも、遺伝要因、社会要因、生活習慣要因など、さまざまな要因について、幅広く調査を行う^{18), 19)}。

この参加者より得られた生体試料における血液分析項目として葉酸が選ばれている。個人に対する調査機関が13年と長期間であるが、途中結果の報告が待たれる。

2. 「成人病（生活習慣病）胎児期発生説」

①出生体重と成人病の発症リスク

少子高齢化が進む日本では、出生人口の増加が大きな課題である。しかし、より重要な点は、生まれてくる次世代の健康を確保することであ



DHF : Dihydrofolate (ジヒドロ葉酸)
 THF : Tetrahydrofolate (テトラヒドロ型葉酸)

図2 赤血球生成の葉酸とB₁₂の反応経路

る。その中、妊娠中に葉酸が不足すると胎児の形成異常や妊娠合併症などが懸念されているが、加えて将来的に成人病を発症するリスクを惹起することが報告されている。

これは「胎芽期、胎児期、乳児期に低栄養や過量栄養の状態にさらされると成人病の素因が形成される」とする「成人病胎児期発生説」(1986年にイギリスのDr. David Barkerによって提唱)に基づくもので、中でも葉酸は特に重要な栄養素と考えられている。

具体的には、肥満、高血圧、脳梗塞、神経発達行動異常、脂質異常症について、出生体重との関連がほぼ確実視されている。また一部のがんや慢性閉塞性呼吸器疾患、骨粗鬆症、うつ病などとの関係も指摘されている。

②日本での低出生体重児の状況

近年、日本では出生児の体重が急速に低下している。低出生体重児とは2,500g以下で生まれた出生児であるが、その数は1975年以降増加し続け、平均出生体重は女児ではすでに3,000gを下回っている。これは成人病リスクの高い成人病予備軍が今後増え続けることを意味する。こ

の出生児体重低下の原因は、妊婦の栄養摂取量不足と考えられる。

栄養摂取量の中からエネルギー摂取量を例に取ると妊娠中に必要なエネルギー量は、初期、中期、末期と増加すべきである。しかし、妊娠期間を通じて摂取エネルギーがほとんど増加していないことが調査で判明している。しかも同世代の非妊婦と比較しても同等の摂取量であった。この栄養状態では胎児が十分発育可能であるか疑問である。

この背景には、日本の若年女性の極端なやせ願望や、今なお一部で「小さく生んで、大きく育てる」ことが正しいと理解されている状況がある。

③成人病素因形成の分子機序と葉酸

胎児期の環境要因により成人病の素因が形成される機序として考えられていることのひとつに、この時期の「遺伝子発現の制御系の変化」があり、この変化は、DNAのメチル化、核ヒストンH3のアセチル化、メチル化などにより起きる²⁰⁾。

妊娠中に葉酸の存在が重要なのは、メチル基

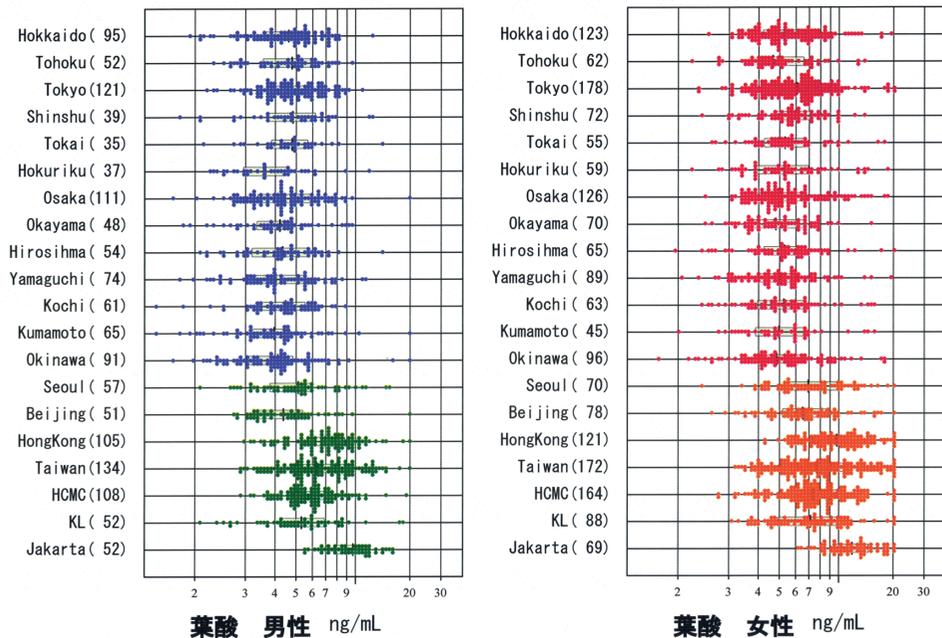


図3 葉酸血中濃度の地域差 (従来法で測定)

(CH₃) の代謝に強く関わっているからである。メチル基代謝メカニズムは、S-アデノシルメチオニンが、S-アデノシルホモシステインになる過程で、メチル基転移酵素によりメチル基が移動し、DNAやヒストン蛋白(クロマチン構造)がメチル化することである。このクロマチン構造によって遺伝子発現が制御される。そしてこのメチル基代謝系には、葉酸が必須である。また胎児期は、クロマチン構造が決定される重要な時期である²⁰⁾。

胎児期に葉酸が慢性的に欠乏すると、メチル基代謝回路がスムーズに機能しなくなりクロマチン構造が通常より変化する。そのためDNA配列が変化しなくても、遺伝子発現が後天的に変化する。出生後も胎児期のクロマチン構造の変化が受け継がれるため、このクロマチン構造の変化が成人病の素因であると考えられている。

以上のように、胎生期から乳児期および母体の栄養状態は重要であり²⁰⁾、現在、国内においては母子バースコホート研究が企画実施されており、葉酸測定も実施されている。

3. 「基準範囲設定国際プロジェクト」

臨床検査における生化学項目の測定値標準化が大きく進捗した状況において共有基準範囲設定のニーズの高まり、国際臨床化学連合(IFCC)の血漿蛋白専門委員会(C-PP)および基準範囲判断値委員会(C-RIDL)、アジア太平洋臨床生化学連合(APFCB)の企画により、日本が主導する形で、大規模な基準範囲設定国際プロジェクトを2009年から2010年に掛けて実施された。

本プロジェクトの特徴として、(1)測定法間差・試薬間差を排除し、測定値の地域性の有無を明確に確認すべく、健常者の全試料を、項目別に1つの検査室に輸送し中央一括測定を行った。また、(2)健常者の新鮮血清でクロスチェックを行うことで、基準範囲の相互変換を保証し、多数の健常者から精度良く求められた基準範囲を、参加施設が"共有"できるようにした。

その結果、HDL-C、IgG、C3、C4、CRP、CA15-3、葉酸(図3)、PTH、adiponectinなど、18項目で3レベル枝分かれ分散分析による判定で明瞭な地域差を認めた。このうち、炎症マーカー検査が日本で低く、東南アジアで高い特徴がみられ、環境因子の関与が想定されるが、そ

れ以外は、遺伝的なものか、食習慣の違いによるものかは明らかでない。しかし、葉酸に関して日本国内での摂取不足が指摘されているが、近隣諸国との比較データが存在しなかった。アジア地区において日本国内の血中葉酸濃度が明確に低値であることが今回の研究で明確になった。これに対し、データを日本に限定すると、全く地域差を認める項目はなかった。なお、測定は、主としてベックマン・コールター社の試薬を用いて、Coulter LHシリーズ(血球検査)、ユニセルDxC 800&AUシリーズ(化学測定・免疫比濁測定)、および、ユニセルDxI 800(イムノアッセイ)で行った²¹⁾。

IV. 葉酸測定法の標準化の必要性

葉酸の古典的な測定法はLactobacillus Caseiを用いた微生物法であったが、この測定法はラジオアイソトープ法と同様、現在では測定範囲が広く精度の向上した自動化測定法にほぼ完全に置き換わっている。しかし、自動化測定法も用いられている標準物質が5-メチルテトラヒドロ葉酸やプテロイルグルタミン酸など測定法により異なること等から、測定方法間で値が一致していない。

The WHO Technical Consultation on folate and vitamin B₁₂ deficiencies(葉酸とビタミンB₁₂欠乏についての世界保健機構の技術諮問会議)は、最近の諸地域サーベイ結果のレビューから葉酸とビタミンB₁₂の血中濃度の低下が様々な発展途上段階の国々にみられており、それらのビタミンの欠乏状態が世界的な公衆衛生問題である可能性があるため、葉酸とビタミンB₁₂の状態の評価と包括を推奨し、併せて血中ビタミン濃度測定に用いられる測定法の標準化と万人に適用できるカットオフ値の設定を2008年に推奨している²²⁾。我が国でも、渭原らは、古典的な葉酸の食事摂取基準である3 ng/mLを見直すため、国内で認証されている自動化測定法3法と微生物法と比較したが、測定法間差が大きく、現在の自動分析機の値にあてはめるには適していないことを報告し²³⁾、測定法の標準化の必要性を訴えるとともに、標準化の方法の研究活動を行っている。

V. 参照標準物質 WHO IS 03/178とSRM1955

測定法の標準化には基準となる参照標準物質が必要である。WHOでは、2005-2006年に血清葉酸の参照標準物質の候補としてWHO International Standard 03/178 (WHO IS 03/178)を作成し、7ヶ国の24施設での測定を行った²⁴⁾。測定には市販の自動分析機10機種や微生物法、ラジオアイソトープ法のほか、葉酸の基準測定操作法 (Reference Measurement procedure) であるLC/MS/MSを用いた。また、別途少量作成した3濃度のサンプルについても同時に測定した。葉酸ビタマーは、5-メチルトロヒドロ葉酸、5-ホルミルトロヒドロ葉酸、葉酸を測定した。WHO IS 03/178のLC/MS/MSでの総葉酸の測定結果の平均値は5.1 ng/mLであり、この値をもとに、各施設のそれぞれの測定法での3濃度のサンプル値について補正すると、補正前の測定間変動係数CVは17.4~19.5%であったが、補正後はCV 5.8~8.8%となり、著しくばらつきが改善され値が収束した²⁴⁾。

WHO IS 03/178の総葉酸の認証値は、血清中葉酸ビタマーのモル濃度の平均値 (5-メチルトロヒドロ葉酸; 9.75 nmol/L、5-ホルミルトロヒドロ葉酸; 1.59 nmol/L、葉酸; 0.74 nmol/L) の総和12.08 nmol/Lから、慣用単位ng/mL (プテ



図4 Access2



図5 ユニセルDxI 800

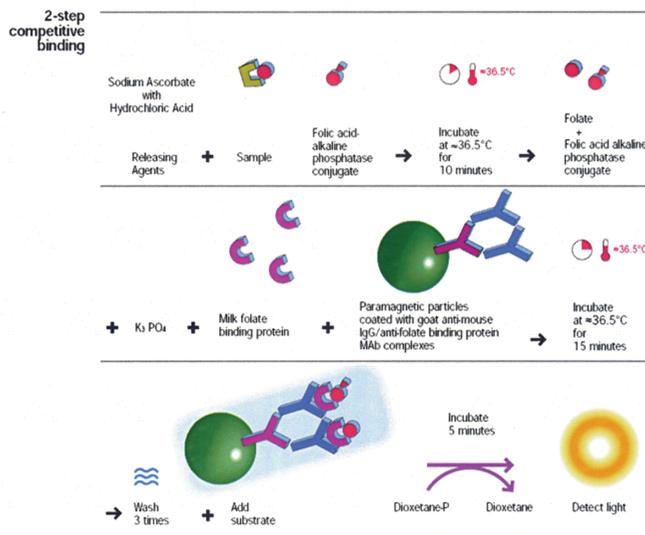


図6 アクセス葉酸の測定反応

ロイルモノグルタミン酸当量)へ変換して(変換係数2.266で除して)求められ、5.33 ng/mLと設定された²⁴⁾。

このWHO IS 03/178は凍結乾燥品(1 mL用)として3,750本が作成され、現在、英国国立生物研究所(NIBSC)から販売されている。

国内では日本臨床化学会栄養専門委員会と日本ビタミン標準化検討協議会が、WHO IS 03/178の供給量が少ないことから、より供給量が確保されているSRM1955を用い、葉酸測定値の標準化(方法間差の収束)に取り組んでいる^{25), 26)}。SRM1955は、WHOとアメリカ標準技術研究所(NIST)の共同開発により作成された3濃度の血清で、WHO IS 03/178と同様、LC/MS/MSで値付けされている。

VI. WHO IS 03/178 準拠試薬

海外では、すでにこのWHO IS 03/178に参照標準物質を変更した試薬が販売されている。ベックマン・コールター(当社)も今年、従来法の「アクセス葉酸(FOL2)」試薬から、葉酸値の正確性をWHO IS 03/178に合わせた新法「アクセス葉酸(FOLW)」(以下「アクセス葉酸(FOLW)」)試薬の国内販売を開始する。それに伴い、国内にて若干の検討を実施したので簡単に報告する。

1) アクセス葉酸アッセイの特長

「アクセス葉酸(FOLW)」はAccessイムノアッセイシステム専用試薬である。装置は、全自動化学発光酵素免疫装置であるAccess 2(最大処理速度100テスト/時間)、ユニセルDxI600(同200テスト/時間)およびユニセルDxI800(同400テスト/時間)の3種がある(図4、5)。試薬は3機種共通であり、また、試薬調製は必要ない。

測定材料については、血清またはヘパリン血漿中の葉酸は検体の前処理なしに測定することができる。赤血球中葉酸の測定では、最初に全血をアスコルビン酸から成る溶血試薬にてマニュアルで処理する。この前処理は赤血球を溶血させ、赤血球中に存在する葉酸ポリグルタミン酸型を血清中に存在するモノグルタミン酸型へ変換する。

表1 同時再現性

試料	Sample-1	Sample-2	Sample-3
平均	3.48	8.42	15.49
SD	0.14	0.18	0.47
CV(%)	4.02	2.15	3.00

表2 日差再現性

試料	Sample-1	Sample-2	Sample-3
平均	3.50	8.67	15.76
SD	0.10	0.17	0.26
CV(%)	2.86	1.92	1.65

測定原理は化学発光を用いた2ステップ競合タンパク結合法である(図6)。

2) 再現性試験

ユニセルDxI800を用いて、3濃度の試料を10重測定した際の同時再現性は、平均値3.48 ng/mLで変動係数CV 4.02%、8.42 ng/mLでCV 2.15%、15.49 ng/mLではCV 3.00%であった(表1)。また、3濃度の試料を1日2回ずつ10日間、計20回測定した際の日差再現性は、平均値3.50 ng/mLでCV 2.86%、8.67 ng/mLで1.92%、15.76 ng/mLで1.65%であった(表2)。

3) 検出感度

キャリブレーション(S0)を10重測定して平均値-2SDから求めた濃度を分析感度(Limit of Blank; LoB, Analytical Sensitivity)とすると、0.14 ng/mLであった。また、低濃度試料をS0を用いて段階的に希釈し、キャリブレーションS0の平均値-2SDと試料の平均値+2SDのRLUが重ならない最小濃度を検出限界(Limit of Detection; LoD)とすると、0.60 ng/mLであった。

4) 希釈直線性

2濃度の検体をS0を用いて希釈したところ、原点に収束する良好な直線が得られた(図7)。

5) 従来法との相関

151例の血清を用いて従来法 (x) と新法 (y) を比較したところ、相関式 $y=1.351x - 0.271$ 、相関係数 $r=0.996$ の相関関係が得られた (図8)。なお、社内外での他の検討からも、測定値は従来法に比べ、新法では約1.30~1.45倍高くなる結果が得られている。

6) 参考基準範囲および葉酸欠乏症のカットオフ値

今回は国内では未実施のため、葉酸強化食品が普及している米国と普及していない英国で健常者の血清および赤血球中葉酸を測定し、ノンパラメトリック両側90%信頼区間で求めた参考基準範囲例を表3に示した。血清中および赤血球中葉酸の参考基準範囲は葉酸強化食品の普及

の有無等、地域や食物等の影響を受けるため、参考指針のひとつとしてとらえ、各施設でその地域に適した範囲を設定することが求められる。特に葉酸は、欠乏症のカットオフ値を考慮することが重要である。

前述のWHO技術諮問会議は、米国の第3次国民健康・栄養調査 (NHANES III) の結果²⁷⁾から、ホモシステイン濃度を上昇させることに基づいて定義した葉酸欠乏症の葉酸濃度として以下を推奨した²²⁾。

血清葉酸 < 4 ng/mL (10 nmol/L)
赤血球中葉酸 < 151 ng/mL (340 nmol/L)

「アクセス葉酸 (FOLW)」アッセイにおいても、従来法の参考基準範囲をJacquesらが報告した葉酸欠乏症のカットオフ値< 3 ng/mL²⁸⁾と社内データに基づき「>3.0 ng/mL」と設定していた

表3 葉酸強化食品の普及地域と普及していない地域の葉酸参考基準範囲

母集団	測定	n (健常人)	参考基準範囲	単位
葉酸強化食品の普及している地域 (米国)	血清中葉酸	171	5.9 ~ >24.8	ng/mL
			13.4 ~ >56.2	nmol/L
	赤血球中葉酸	144	366 ~ >1356	ng/mL packed RBCs
葉酸強化食品の普及していない地域 (英国)	血清中葉酸	311	3.1 ~ 19.9	ng/mL
			7.0 ~ 45.1	nmol/L
	赤血球中葉酸	190	140 ~ 836	ng/mL packed RBCs
			317 ~ 1894	nmol/L packed RBCs

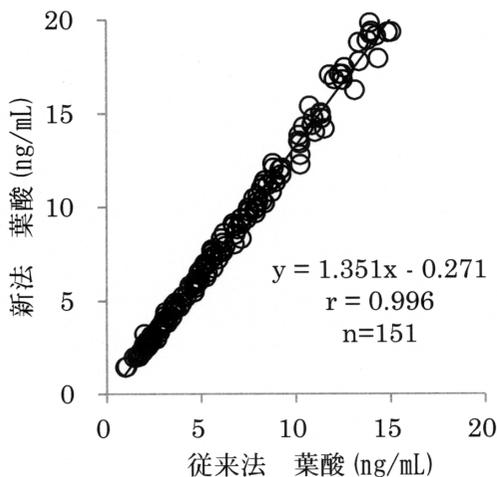


図7 希釈試験

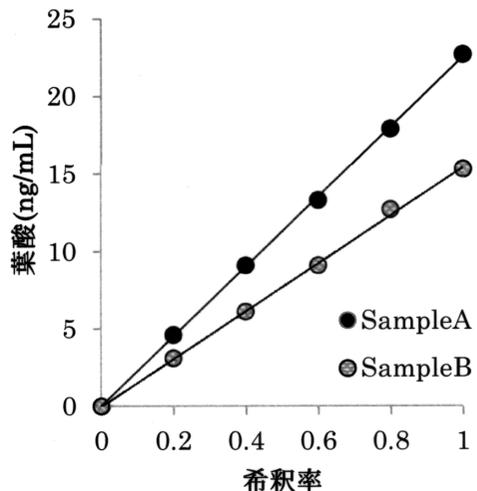


図8 従来法との相関

が、値付け変更に伴い、前述のWHO技術諮問会議の推奨している葉酸欠乏症の血清中葉酸濃度 < 4 ng/mL (10 nmol/L)^{22), 27)} に従って試薬添付文書上の参考基準範囲を「 ≥ 4.0 ng/mL (≥ 10 nmol/L)」に変更した。

VII. 結語

葉酸とビタミンB₁₂の欠乏症についてのWHO技術諮問会議が提言した標準化とカットオフ値の設定の必要性の観点からいえば、葉酸測定については、LC/MS/MSで値付けされた複数の参照標準物質が入手可能となり、測定値の標準化が今後推進されると思われる。葉酸は貧血のほか、心疾患や骨粗鬆症など様々な疾患との関連が注目されており、今後、さらに測定されるようになるものと考えられ、そのためにも、測定法の標準化が望まれる。

謝辞

本稿の執筆中、東邦大学 涓原 博先生と山口大学 市原 清志先生に有益なコメントを頂戴しました。心より感謝致します。

参考文献

- 1) 日本ビタミン学会: ビタミンの辞典, 朝倉書店, 東京, (1996)
- 2) 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書: 日本人の食事摂取基準2010年版, 第一出版, 東京, (2010)
- 3) 五十嵐 脩: オックスフォード食品・栄養学辞典, 朝倉書店, 東京, (2002)
- 4) 日本ビタミン学会: ビタミン研究のブレイクスルー, 学進出版, 横浜, (2002)
- 5) 高折修二: グッドマン・ギルマン薬理書 第9版, 廣川書店, 東京, (1999)
- 6) 細谷憲政: ヒューマン・ニュートリション 第10版, 医歯薬出版, 東京, (2004)
- 7) 福島雅典: メルクマニュアル 第18版 日本語版, 日経BP社, 東京, (2006)
- 8) Mulinare J, Cordero JF: Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA*, 260(21): 3141-5, 1988.
- 9) Bower C, Stanley FJ: Periconceptional vitamin supplementation and neural tube defects; evidence from a case-control study in Western Australia and a review of recent publications. *J Epidemiol Community Health*, 46(2): 157-61, 1992.
- 10) Milunsky A, Jick H: Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA*, 262(20): 2847-52, 1989.
- 11) Werler MM, Shapiro S: Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA*, 269(10): 1257-61, 1993.
- 12) Shaw GM, Schaffer D: Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology*, 6(3): 219-26, 1995.
- 13) Laurence KM, James N: Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 282(6275): 1509-11, 1981.
- 14) Wald NJ: Folic acid and neural tube defects: the current evidence and implications for prevention. *Ciba Found Symp*, 181: 192-208 discussion 208-11, 1994.
- 15) Smithells RW, Nevin NC: Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet*, 1(8332): 1027-31, 1983.
- 16) Vergel RG, Sanchez LR: Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn*, 10(3): 149-52, 1990.
- 17) Czeizel AE, Dudkó I: Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*, 327(26): 1832-5, 1992.
- 18) エコチル調査ホームページ (<http://www.env.go.jp/chemi/ceh/index.html>)
- 19) エコチル調査研究計画書ホームページ (<http://www.env.go.jp/chemi/ceh/outline/data/kenkyukei/kaku114.pdf>)
- 20) 福岡秀興: 新しい成人病(生活習慣病)の発症概念. *京府医大誌*, 118(8): 501-514, 2009.
- 21) 市原清志: 日本臨床検査自動化学会会誌: 基準範囲の実践マニュアル Ver. 1.0 第37号 Suppl.1: 15-54, 2012.
- 22) de Benoist B: Conclusion of a WHO technical consultation on folate and vitamin B₁₂ deficiencies. *Food Nutr Bull*, 29: S238- S244, 2008.
- 23) Ihara H, Hashizume N, Totani M, Inage H, Kimura S, Nagamura Y, Sudo K, Aoki Y, Saeki H, Sagawa N, Kamioka K, Shimizu K, Watanabe R, Watanabe M, Hirayama K, Nakamori M, Takenami K, Yoshida M, Kawasaki Y, Ogiwara T, Kawai T, Watanabe T: Traditional reference values for serum vitamin B₁₂ and folate are not applicable to automated serum vitamin B₁₂ and folate assays: comparison of value from three automated serum vitamin B₁₂ and folate assays. *J Anal Bio-Sci*, 31: 291-298, 2008.
- 24) Thorpe SJ, Heath A, Blackmore S, Lee A, Hamilton M,

- O'broin S, Nelson BC, Pfeiffer C: Second international standard for vitamin B₁₂ and first international standard serum folate: Corrected and updated report of the international collaborative study to evaluate a batch of lyophilized serum for B₁₂ and folate content. Expert Committee on Biological Standardization, Geneva, 23 to 27 October 2006. <http://www.who.int/bloodproducts/cs/062052vitaminb12.pdf>.
- 25) Ihara H, Watanabe T, Hashizume N, Totani M, Kamioka K, Onda K, Sunahara S, Suzuki T, Itabashi M, Aoki Y, Ishibashi M, Ito S, Ohashi K, Enomoto T, Saito K, Saeki K, Nagamura Y, Nobori T, Hirota K, Fujishiro K, Maekawa M, Miura M, Ohta Y: Commutability of National Institute of Standards and Technology standard reference material 1955 homocysteine and folate in frozen human serum for total folate with automated assays. *Ann Clin Biochem*, 47: 541-548, 2010.
- 26) 渭原 博, 橋詰直孝: 特集「ビタミン測定法の現状と課題」[Ⅱ] 総説 ビタミン測定標準法と基準値. *ビタミン*, 85: 280-290, 2011.
- 27) Selhub J, Jacques PF, Dallal G, Choumenkovitch S, Rogers G: The use of blood concentrations of vitamins and their respective functional indicators to define folate and vitamin B₁₂ status. *Food Nutr Bull*, 29: S67-S73, 2008.
- 28) Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH: The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med*, 13; 340: 1449-1454, 1999.